γPNA-一种新型高效的肽核酸*

邱　浩　汪铭书　程安春[五]

(四川农业大学动物医学院禽病防治研究中心 四川农业大学预防兽医研究所 动物疫病与人类健康四川省重点实验室 成都市 611130)

摘要　肽核酸（peptide nucleic acid，PNA）是一种人工合成的具有类多肽骨架的 DNA 类似物，具有与核酸结合特异性强、组织和细胞内生物稳定性好、半衰期长等优点。通过靶向结合 DNA/RNA 而抑制其复制、转录和翻译过程，进行基因调控。在 PNA 骨架结构中γ位点引入带手性的官能团，能形成右手螺旋结构，显著提高其与靶 DNA/RNA 的杂交特性，这种 PNA 衍生物被称为γPNA。γPNA 的溶解性、热稳定性和特异性等化学与生物学特性明显改善，在基因编辑和作为探针检测等方面具有良好的应用前景。通过对γPNA 结构、性质及其研究进展进行总结，以期为γPNA 反义应用提供理论依据和参考。

关键词　γPNA　基因调控　探针检测　反义应用

中图分类号　Q75

γPNA-A New Type of High Efficient Peptide Nucleic Acid*

QIU Hao　WANG Ming-shu　CHENG An-chun**

(Research Center of Avian Disease, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University　Institute of Preventive Veterinary Medicine Sichuan Agricultural University　Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province　Chengdu 611130, China)

Abstract　Peptide nucleic acid (PNA) is a synthetic analogue of DNA with the pseudopeptide backbone, which has the advantages of strong binding specificity with nucleic acid, high biological stability in tissues and cells and long half-life. By targeting DNA/RNA binding, PNA could inhibit the replication, transcription and translation of DNA/RNA. Chiral functional groups were introduced at gamma sites of the skeleton structure of PNA to form right-handed helical structures, which significantly improved the hybridization with targeting DNA/RNA, and this PNA derivative was called gamma PNA. The solubility, thermal stability and specificity of gamma PNA have been improved remarkably, and it has a good prospect in gene editing and probe detection. The structure, properties and research progress of gamma PNA are summarized, which provides theoretical basis and references for antisense PNA application.

Keywords　γPNA　Gene regulation　Probe detection　Antisense application

* 国家自然科学基金(No.31572521) 、国家现代农业（水禽）产业技术体系专项(CARS-42-17)和动物疫病与人类健康四川省重点实验室专项(2016JPT0004)

[五] 通讯作者，电子信箱：chenganchun@vip.163.com

1991年，哥本哈根大学Riso实验室Nielsen等用计算机设计了一种DNA类似物—肽核酸（peptide nucleica cids，PNA），由N-(2-氨乙基)甘氨酸通过酰胺键重复结构单元连接而成，利用有机化学与“小分子”来解决及探究生物学问题[1]。PNA能作为核酸探针进行病原体检测[2]与反义药物进行抗菌应用[3]，特别是在抑制多重耐药菌株的应用研究比较广泛[4, 5]。但由于PNA为非手性结构，呈电中性；分子量大，与靶基因结合存在传递屏障，细胞通透性差，作用效果减弱，使其反义应用受到限制[6, 7]。在PNA骨架结构中引入具有手性的官能团，由此产生了大量的PNA衍生物，如αPNA、βPNA和γPNA等，形成右手螺旋结构，与靶基因结合的亲和性提高；非特异性反应减少，极少产生脱靶效应；杂交复合物的稳定性提高；细胞通透性增大，有利于细胞吸收[8, 9]。这些新型PNA对靶基因进行生物学调控，能够比PNA更好地评估和控制基因的表型效应[10]。目前γPNA被认为是杂交特性比较好的一种肽核酸，明显优于αPNA、βPNA，具有良好的应用潜力[11]。通过对γPNA的结构、性质及其应用进行探讨，为其在生物学与医学领域研究提供理论基础和参考。

1 γPNA 的结构

γPNA的结构（如图1a）[12]，其结构里中性的N-(2-氨基乙基)甘氨酸骨架替代了DNA结构（如图1b）中带负电的核糖磷酸骨架，消除了两个单链核酸通过碱基互补配对时的静电作用，使其与靶基因的亲和性增强，结合稳定性更高。在PNA的γ位点插入一个合适的立体中心能形成左手螺旋或右手螺旋结构，其中添加S型手性中心表现出经典的右手螺旋结构，因为氨基酸侧链CH3与N4’之间相互作用力较小，而添加R型手性中心则形成左手螺旋结构，因为氨基酸侧链CH3与N4’之间相互作用力增加[13]。添加L-氨基酸能形成右手螺旋结构（如图1c），添加D-氨基酸则形成左手螺旋结构（如图1d）[12]。然而，仅右手螺旋γPNA对DNA有较高的亲和力与特异性[14]，在DNA双链结构中易形成互补核酸，增强与靶基因的结合，虽然有报道L型γPNA聚集的程度较D型γPNA高，但对杂交DNA整体影响较小[15, 16]。

图1　γPNA的分子结构与螺旋结构

Fig.1　Molecular structure and helix structure of γPNA

(a) γPNA　(b) DNA　(c) Right Handed Helix　(d) Left Handed Helix

2　γPNA 的性质

γPNA结构中添加二甘醇（diethylene glycol，miniPEG）能提高热稳定性；添加氨基和胍基能增大细胞通透性；添加赖氨酸、天冬氨酸、聚乙二醇能增强特异性，这些官能团的添加使其杂交靶基因的理化性质和生物学特性显著提升。同时，γPNA具有PNA固有的一些性质，如高度的生物学稳定性，没有核酸酶与蛋白酶的识别位点，不被核酸酶和蛋白酶所降解，这些性质对γPNA作为反义药物进入生物体内发挥作用提供了重要保障。

2.1　γPNA的热稳定性

在PNA骨架结构中γ位点添加二甘醇能提高其热稳定性，与PNA/DNA杂交相比，γPNA-miniPEG/DNA杂交形成复合物的T_m提高了23℃[17]。应用原子力显微镜探查γPNA-miniPEG/DNA杂交的结合强度，分析三螺旋断裂产生的动力曲线，测量断裂力，γPNA-DNA螺旋结构的断裂力为65±15pN，而DNA-DNA螺旋结构的断裂力为45±15pN。采用Bell-Evans模型进行数据分析，得到解离常数γPNA-DNA为0.030±0.01S^{-1}，DNA-DNA为0.375±0.18S^{-1}，表明γPNA-DNA结构的热稳定性高于DNA-DNA结构[18, 19]。

由于与靶DNA的结合是局部入侵作用，γPNA与DNA仅有几纳米的空间距离，结合竞争十分激烈，如果在这个作用过程中存在碱基错配，将导致形成的复合体

结构极不稳定[20, 21]。Goldman等[22]研究表明，在γPNA中添加聚乙二醇，一条12bp的γPNA探针形成γPNA-DNA的T_m为70.1℃，普通PNA探针形成PNA-DNA的T_m为46.1℃，DNA探针形成DNA-DNA的T_m仅为38℃。可见，在最佳匹配靶序列的γPNA应用中，形成的γPNA-DNA复合体结构将十分稳定。

2.2 γPNA 的细胞通透性

近年来，脂质体制剂、结合细胞穿膜肽、显微注射和电转等呈递小分子物质进入细胞的方法虽然一直在使用[23, 24]，但仍存一些问题，如结合含有大量阳离子的多聚赖氨酸、多聚精氨酸等穿膜肽会引起细胞毒性，脂质体的半衰期短等[25]。Sahu等[26]在γPNA中添加二甘醇，能使其水溶性增大，与靶DNA杂交的亲和力增强，有利于细胞吸收。

γPNA中添加氨基和胍基的细胞穿透能力可以通过活细胞成像技术研究证实。Kumar等[27]发现γPNA能有效渗透进MCF-7细胞，并在细胞质中核膜附近积聚，说明在结构优化的情况下，γPNA不需要添加细胞穿膜肽与应用其它细胞渗透方法也能进入细胞发挥反义作用。γPNA添加氨基与胍基数量的不同，γPNA的细胞渗透作用具有一定的差异性[28]。通过荧光标记γPNA，作用于MCF-7细胞，在荧光显微镜下观察带有荧光的细胞数目，结果PNA为18%，单氨基γPNA为30%，双氨基γPNA为50%；单胍基γPNA为42%，双胍基γPNA为62%，三胍基γPNA为70%，其细胞渗透作用较PNA增强了近4倍，说明在一定条件下，γPNA氨基与胍基数量的增加会增强细胞渗透作用[11]。Englund等[29]研究表明，荧光基团修饰γPNA主链或侧链，对DNA杂交几乎没有任何影响。

2.3 γPNA的杂交特异性

在正常生理条件下，γPNA结构中带负电荷的天冬氨酸表现出与RNA高度的特异性，而带正电荷的赖氨酸则表现出与DNA更高的特异性[30]。Iverson等[31]研究表明，在一定浓度下，PNA趋于聚集和以非特异性方式与其它分子杂交结合，导致脱靶效应的产生。Sahu等[32]在γPNA中添加聚乙二醇，通过电泳试验比较PNA与γPNA的脱靶效应，将一条不包含靶序列的171bp的DNA片段分别与不同浓度的未修饰PNA（PNA6）或γ位点修饰的PNA（PNA10）在10mM PBS缓冲液中37℃孵育16h。在PNA6为10uM（PNA：DNA=25：1）或者更高浓度的情况下，DNA在凝胶中条带完全消失，可能是由于PNA6-DNA复合物从溶液中析出或者在样品

孵育过程中附着在EP管中；而PNA10作用后的DNA条带仍旧保持恒定，即使在高浓度20uM(PNA：DNA=50:1)条件下也是同样的结果。说明γPNA能减少与非特异性分子的结合，避免脱靶效应的发生。

Sahu等[32]通过荧光共振能量转移证明γPNA极少发生自我聚集，20uM PNA的重叠效率达70%，而γPNA的重叠效率仅为5%。同时，在荧光共聚焦显微镜下，PNA在室温下散发出橙色光，在90℃时发出黄绿色光，说明在温度升高的情况下，PNA聚集减少，而γPNA在室温与90℃下均呈黄绿色，表明γPNA能够抑制自我聚集的发生，表现出极高的特异性。

3 γPNA 的作用机制

3.1 γPNA 与 DNA 杂交复合体形成

γPNA 表现出可选择性的二级结构，通过 Hoogsteen 键与 Watson-Crick 氢键与 DNA 形成γPNA-DNA 杂交复合物，并能在钠或钾阳离子中稳定存在[33]。γPNA 通过结合单链或者双链 DNA 分子，与靶 DNA 形成具有不同化学结构和分子计量的稳定复合物（如图 2）[34, 35]。γPNA 与单链 DNA 通过碱基互补配对原则可形成稳定的双链结构（如图 2a）。此外，γPNA 还可与双链 DNA 形成以下几种杂交复合体：γPNA 在双链 DNA 的外侧，以 Watson-Crick 氢键的方式与互补的碱基配对，形成不稳定的γPNA-DNA_2复合体结构（如图 2b）；γPNA 一方面通过 Watson-Crick 氢键的方式与 DNA 结合，另一方面通过 Hoogsteen 键的方式与γPNA-DNA 结合，形成稳定的γPNA_2-DNA 复合物；同时形成的γPNA_2-DNA 复合物也可通过链侵袭双链 DNA，替换其中一条 DNA，另一条链则突出于复合体外，形成 D 环结构（如图 2c）；γPNA 的两条链也可分别于 DNA 链结合形成γPNA_2-DNA_2复合物（如图 2d）。Roy 等[36]研究中，三分子的 PNA 能与一分子的 DNA 形成四聚体复合物，这种不对称结构表明设计γPNA 时添加官能团修饰的可能。因此，当前研究致力于改进 PNA 的骨架结构，增强与靶 DNA/RNA 的杂交特性，同时减少一些原有的不足，包括溶解性、生物利用度、功能性等。

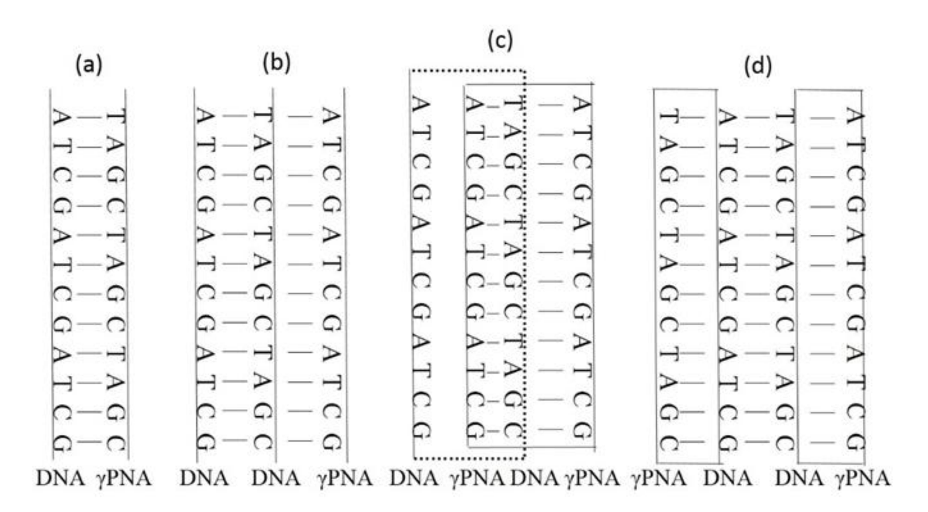


图 2　γPNA 与 DNA 杂交复合体结构

Fig.2　Structure of γPNA and DNA hybrid complexes

(a) γPNA-DNA　(b) γPNA-DNA_2　(c) $γPNA_2$·DNA-DNA　(d) $γPNA_2$-DNA_2

3.2　γPNA 对基因进行反义调控

3.2.1　γPNA 调控转录

γPNA 对转录的调控具有双向性，可抑制转录和激活转录。抑制转录时γPNA 结合于双链 DNA 的模板链上，γPNA 形成的稳定复合体结构可终止 RNA 聚合酶的延伸，破坏 DNA 双螺旋结构，同时完全阻断蛋白（如转录因子和 RNA 聚合酶）对 DNA 的识别。激活转录时γPNA 则结合于双链 DNA 的非模板链上，PNA 与双链 DNA 形成$(PNA)_2$·DNA-DNA 复合体，模板链产生的单链 DNA 环可以被 RNA 聚合酶识别，激活转录。PNA 也可有效地与反转录病毒（如 HIV）的 RNA 结合，形成空间位阻，阻断逆转录酶在 RNA 链上的延伸[37]。

3.2.2　γPNA 调控翻译

γPNA 对翻译的调控是通过与 RNA 结合进而在空间上干扰 RNA 的加工、RNA 向细胞质的运输以及翻译的进程，阻止核糖体与 mRNA 的结合来调控蛋白的表达（如图 3）[38]。

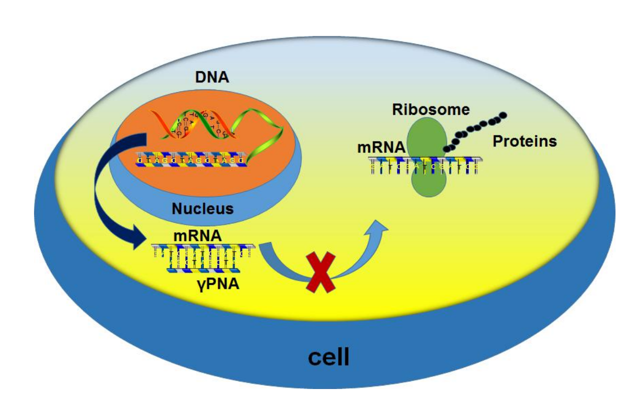


图 3　γPNA 调控翻译

Fig.3　Regulation of translation by γPNA

Canady 等[39]通过两个互补γPNA 单体分子实现可逆性翻译调控，一个γPNA 靶向结合 mRNA 能抑制翻译，另一个γPNA 通过 PNA-PNA 取代作用能去抑制翻译，在去抑制翻译过程中，mRNA 转录通过链置换从每个位点将释放一个完整的功能原始 mRNA，反义抑制消除，翻译开始。γPNA 在调控翻译的过程中表现出亲和力强与特异性高等特性，使得整个调控过程十分稳定，几乎没有脱靶效应。PNA 结合在起始密码子区域、5’-UTR 和编码区，都能阻碍翻译。在起始密码子区域，通过形成三螺旋复合物结构阻碍 80S 核糖体与 mRNA 结合；而在编码区，γPNA 与 mRNA 结合的复合物可阻碍核糖体在 RNA 链上的移动[39]。

3.2.3　γPNA 调控复制

Smith 等[40]人工合成的 PNA 能选择性的阻止突变 DNA 的复制，并允许野生型 DNA 分子的复制。Muratovska 等[41]设计了有亲脂性磷离子的 PNA，可以在跨内膜电位的驱使下穿过脂质双层，在人细胞线粒体内选择性地调控线粒体 DNA 的复制和表达。

4　γPNA 的应用

PNA 进行基因编辑已有较多的研究，如转录的调控[42]、前体 mRNA 剪切[43]、mRNA 翻译[44]、miRNA 功能[45]等，已经取得了一定成果。γPNA 作为 PNA 的新一代衍生物，不仅具有 PNA 固有的一些优越特性，同时，由于γ位点的各种官能团修饰，显著改进了原有 PNA 的不足，使其作用效果更加明显。可以用作分子探针检测核酸序列信息，调节基因表达水平，进行基因编辑，达到治疗与诊断的目的[46]。

4.1　γPNA 在基因调控及治疗方面的应用

γPNA 的三螺旋特定位点结构能进行基因调控[47]。Mcneer 等[48]在γPNA 中添加干细胞刺激因子，在人类地中海贫血小鼠模型造血干细胞中产生高水平的基因调控作用，能进行基因修正多达 7%的β球蛋白，并且产生的脱靶效应极低。Bahal 等[49]和 Svasti 等[50] 通过绿色荧光蛋白(EGFP)报告基因观察γPNA 对突变的β球蛋白核苷酸修正情况。突变小鼠β球蛋白 654-2 激活一个异常剪接位点，导致β球蛋白内含子片段 EGFPmRNA 翻译受阻，抑制 EGFP 蛋白表达；通过γPNA 在体外对突变的供体 DNA(β球蛋白/EGFP 融合基因)进行修正后导入突变小鼠体内，恢复正常剪接和允许 EGFP 表达，荧光显微镜与流式细胞仪检测结果表明：γPNA/供体 DNA 基因调控效率为 0.1%与 0.05%；PNA 为 0.02%的基因调控效率，错配 PNA 仅有 0.002%，几乎没有作用效果，说明γPNA 较 PNA 在基因调控方面具有明显优势。

镰刀状细胞贫血和地中海贫血的治疗，旨在提高γ-球蛋白的表达，使得血红蛋白水平升高。一些药理学诱导剂（如 5-氮杂胞苷、羟基脲、丁酸）有一些作用效果，但也存在一定的局限性，并且需要长期治疗。在研究中发现，γPNA/供体 DNA 能特异性靶向重组细胞γ-球蛋白基因位点，进行基因调控，加强γ-球蛋白表达，达到治疗的目的[51, 52]。

γPNA 添加香豆素（C6）染料，尾静脉注射小鼠，流式细胞仪检测表明，5h 后 C6 分布到骨髓、血液和脾脏细胞中。在研究过程中，未发现小鼠任何系统性毒性或疼痛的迹象。5 天末，流式细胞仪检测γPNA 残余量，骨髓细胞为 0.11%，脾脏中为 0.08%，血液中为 0.09%。说明γPNA 无毒，且能很好地应用于基因调控[49, 53]。

4.2　γPNA 在细菌检测方面的应用

γPNA 长度一般为 12-18bp，可靶向作用于微生物基因组内或者种内保守区域，如细菌 16S rRNA 或真菌 18S rRNA[54]。在金黄色葡萄球菌与表皮葡萄球菌研究中，γPNA 探针能够快速、靶向捕获经 5’半抗原修饰 PCR 引物扩增的 16S rRNA 片段，同源性大于 99.5%的片段在捕获过程中 5min 内达到饱和；而在严格的杂交条件下，DNA 探针捕获一般需要几个小时。错配的γPNA 几乎没有捕获到金黄色葡萄球菌靶片段，说明γPNA 对靶基因的选择具有高度特异性[55]。相比于 DNA 探针或者 PNA 探针，具有明显的动力学优势，同时满足严格的杂交要求，

因此可大大降低临床检测时间[55, 56]。

Jork等[54]利用γ-PNA能在血液中快速检测出能引起极高的发病率和死亡率细菌和真菌，不需要经过常规的血平板培养，对大肠埃希菌、金色类葡萄球菌、表皮葡萄球菌和肺炎链球菌等61份临床样本的检测中，表现出95.5%的敏感性与89.5%的特异性，与血平板培养的一致性达到了91.8%，说明γPNA能够用于探针检测病原菌。

Radic等[55]利用PNA进行酵母菌鉴定，在检测的25份酵母菌样本中，21/25（84%）的菌株鉴定正确，3/25（12%）的菌株鉴定不确定，1株鉴定有误。常规检测需4-7天，而本检测方法仅需约90分钟，时间大大缩短，精确性比较高，这可能是由于PNA能够链侵袭双螺旋DNA，而不是杂交单链DNA，使得杂交特异性更高。

5 展望

PNA在体外结合细胞穿膜肽靶向抑制细菌必需基因（如gyrA基因、rpoD基因、FtsZ基因、acpP基因）可明显下调靶基因表达水平，能有效抑制细菌生长，尤其在多重耐药菌株方面应用更加广泛，且尚未有PNA产生耐药性的报道。而γPNA作为常规PNA的修饰性衍生物，其结构、性质更优，表明将其应用于抗菌治疗具有不可估量的潜力，应该会成为未来研究重点。

参考文献

[1] Nielsen P E, Egholm M, Berg R H, et al. Sequence-selective recognition of DNA by strand displacement with a thymine-substituted polyamide.[J]. Science. 1991, 254(5037): 1497-1500.

[2] Harris D M, Hata D J. Rapid identification of bacteria and Candida using PNA-FISH from blood and peritoneal fluid cultures: a retrospective clinical study.[J]. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials. 2013, 12(1): 2.

[3] Mondhe M, Chessher A, Goh S, et al. Species-selective killing of bacteria by antimicrobial peptide-PNAs.[J]. Plos One. 2014, 9(2): e89082.

[4] Rajasekaran P, Alexander J C, Seleem M N, et al. Peptide nucleic acids inhibit growth of Brucella suis in pure culture and in infected murine macrophages - International Journal of Antimicrobial Agents[J]. International Journal of Antimicrobial Agents. 2013, 41(4): 358-362.

[5] Ghosal A, Nielsen P E. Potent antibacterial antisense peptide-peptide nucleic acid conjugates against Pseudomonas aeruginosa[J]. Nucleic Acid Ther. 2012, 22(5): 323-334.

[6] Shiraishi T, Nielsen P E. Cellular delivery of peptide nucleic acid (PNA)[J]. Advanced Drug Delivery Reviews. 2014, 55(2): 267-280.

[7] Karkare S, Bhatnagar D. Promising nucleic acid analogs and mimics: characteristic features and

applications of PNA, LNA, and morpholino[J]. Applied Microbiology & Biotechnology. 2006, 71(5): 575-586.

[8] Dezhenkov A V, Tankevich M V, Nikolskaya E D, et al. Synthesis of anionic peptide nucleic acid oligomers including γ-carboxyethyl thymine monomers[J]. Mendeleev Communications. 2015, 25(1): 47-48.

[9] Cola C D, Manicardi A, Corradini R, et al. Carboxyalkyl peptoid PNAs: synthesis and hybridization properties[J]. Tetrahedron. 2012, 68(2): 499-506.

[10] Sugiyama T, Imamura Y, Demizu Y, et al. β-PNA: Peptide nucleic acid (PNA) with a chiral center at the β-position of the PNA backbone[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2011, 21(24): 7317-7320.

[11] Jain D R, Anandi V L, Lahiri M, et al. Influence of pendant chiral C(γ)-(alkylideneamino/guanidino) cationic side-chains of PNA backbone on hybridization with complementary DNA/RNA and cell permeability.[J]. Journal of Organic Chemistry. 2014, 79(20): 9567-9577.

[12] Dragulescu-Andrasi A, Rapireddy S, Frezza B M, et al. A simple gamma-backbone modification preorganizes peptide nucleic acid into a helical structure.[J]. Journal of the American Chemical Society. 2006, 128(31): 10258-10267.

[13] Crawford M J, Rapireddy S, Bahal R, et al. Effect of Steric Constraint at the γ-Backbone Position on the Conformations and Hybridization Properties of PNAs[J]. Journal of Nucleic Acids. 2011, 2011(06): S173.

[14] Sahu B, Chenna V, Lathrop K L, et al. Synthesis of conformationally preorganized and cell-permeable guanidine-based gamma-peptide nucleic acids (gammaGPNAs)[J]. Journal of Organic Chemistry. 2009, 74(4): 1509.

[15] Sugiyama T, Kittaka A. ChemInform Abstract: Chiral Peptide Nucleic Acids with a Substituent in the N-(2-Aminoethyl)glycine Backbone[J]. Cheminform. 2012, 18(1): 287-310.

[16] Gaofei H, Srinivas R, Raman B, et al. Strand invasion of extended, mixed-sequence B-DNA by gammaPNAs.[J]. Journal of the American Chemical Society. 2009, 131(131): 12088-12090.

[17] Bahal R, Sahu B, Rapireddy S, et al. Sequence-Unrestricted, Watson–Crick Recognition of Double Helical B-DNA by (R)-MiniPEG-γPNAs[J]. ChemBioChem. 2012, 13(1): 56-60.

[18] Dutta S, Armitage B A, Lyubchenko Y L. Probing of miniPEGγ-PNA-DNA Hybrid Duplex Stability with AFM Force Spectroscopy.[J]. Biochemistry. 2015, 10(55): 1523-1528.

[19] Viéville J M, Barluenga S, Winssinger N, et al. Duplex formation and secondary structure of γ-PNA observed by NMR and CD.[J]. Biophysical Chemistry. 2015, 210: 9-13.

[20] Rapireddy S, He G, Roy S, et al. Strand invasion of mixed-sequence B-DNA by acridine-linked, gamma-peptide nucleic acid (gamma-PNA).[J]. Journal of the American Chemical Society. 2013, 129(50): 15596-15600.

[21] Mitra R, Ganesh K N. Aminomethylene Peptide Nucleic Acid (am-PNA): Synthesis, Regio-/Stereospecific DNA Binding, And Differential Cell Uptake of (α/γ,R/S)am-PNA Analogues[J]. Journal of Organic Chemistry. 2012, 77(13): 5696-5704.

[22] Goldman J M, Li A Z, Manna A, et al. High Affinity γPNA Sandwich Hybridization Assay for Rapid Detection of Short Nucleic Acid Targets with Single Mismatch Discrimination[J]. Biomacromolecules. 2013, 14(7): 2253-2261.

[23] Kaneti L, Bronshtein T, Malkah D N, et al. Nanoghosts as a Novel Natural Nonviral Gene Delivery Platform Safely Targeting Multiple Cancers.[J]. Nano Letters. 2016, 16(3): 1574-1582.

[24] Kulbacka J, Pucek A, Kotulska M, et al. Electroporation and lipid nanoparticles with cyanine IR-780 and flavonoids as efficient vectors to enhanced drug delivery in colon cancer.[J]. Bioelectrochemistry. 2016, 110: 19-31.
[25] Zhang X S, Huang J, Zhan C Q, et al. Different Influences of Lipofection and Electrotransfection on In Vitro Gene Delivery to Primary Cultured Cortex Neurons.[J]. Pain Physician. 2016, 19(3): 189-196.
[26] Sahu B, Sacui I, Rapireddy S, et al. Synthesis and characterization of conformationally preorganized, (R)-diethylene glycol-containing γ-peptide nucleic acids with superior hybridization properties and water solubility.[J]. Journal of Organic Chemistry. 2011, 76(14): 5614-5627.
[27] Kumar P, Jain D R. C γ -Aminopropylene peptide nucleic acid (amp -PNA): chiral cationic PNAs with superior PNA:DNA/RNA duplex stability and cellular uptake[J]. Tetrahedron. 2015, 71(21): 3378-3384.
[28] Kirillova Y, Boyarskaya N, Dezhenkov A, et al. Polyanionic Carboxyethyl Peptide Nucleic Acids (ce-PNAs): Synthesis and DNA Binding.[J]. Plos One. 2015, 10(10): e140468.
[29] Englund E A, Appella D H. Synthesis of gamma-substituted peptide nucleic acids: a new place to attach fluorophores without affecting DNA binding[J]. Organic Letters. 2005, 7(16): 3465-3467.
[30] Costa N T S D, Heemstra J M. Differential DNA and RNA sequence discrimination by PNA having charged side chains[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 2014, 24(10): 2360-2363.
[31] Iverson D, Serrano C, Brahan A M, et al. Characterization of the structural and protein recognition properties of hybrid PNA-DNA four-way junctions.[J]. Archives of Biochemistry & Biophysics. 2015, 587: 1-11.
[32] Sahu B, Sacui I, Rapireddy S, et al. Synthesis and Characterization of Conformationally-Preorganized, MiniPEG-Containing γPNAs with Superior Hybridization Properties and Water Solubility[J]. The Journal of organic chemistry. 2011, 76(14): 5614-5627.
[33] Bochman M L, Paeschke K, Zakian V A. DNA secondary structures: stability and function of G-quadruplex structures.[J]. Nature Reviews Genetics. 2012, 13(11): 770-780.
[34] Kuhn H, Sahu B, Rapireddy S, et al. Sequence specificity at targeting double-stranded DNA with a gamma-PNA oligomer modified with guanidinium G-clamp nucleobases[J]. Artificial Dna Pna & Xna. 2010, 1(1): 45-53.
[35] Krupnik O V, Lazurkin Y S. [PNA-DNA triplexes: stability and specificity].[J]. Genetika. 2005, 41(7): 869-883.
[36] Roy S, Zanotti K J, Murphy C T, et al. Kinetic Discrimination in Recognition of DNA Quadruplex Targets by Guanine-Rich Heteroquadruplex-Forming PNA Probes[J]. Chemical Communications. 2011, 47(30): 8524-8526.
[37] Turner J J, Ivanova G D, Verbeure B, et al. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells.[J]. Nucleic Acids Research. 2005, 33(21): 6837.
[38] Corradini R, Sforza S, Tedeschi T, et al. Peptide nucleic acids with a structurally biased backbone. Updated review and emerging challenges[J]. Current Topics in Medicinal Chemistry. 2011, 11(12): 1535-1554.
[39] Canady T D, Telmer C A, Oyaghire S N, et al. In Vitro Reversible Translation Control Using γPNA Probes.[J]. Journal of the American Chemical Society. 2015, 137(32): 10268-10275.
[40] Smith P M, Ross G F, Wardell T M, et al. The use of PNAs and their derivatives in mitochondrial gene therapy[J]. Letters in Peptide Science. 2003, 10(3-4): 353-360.

[41] Muratovska A, Lightowlers R N, Taylor R W, et al. Targeting peptide nucleic acid (PNA) oligomers to mitochondria within cells by conjugation to lipophilic cations: implications for mitochondrial DNA replication, expression and disease[J]. Nucleic Acids Research. 2001, 29(9): 1852-1863.

[42] Janowski B A, Kaihatsu K, Huffman K E, et al. Inhibiting transcription of chromosomal DNA with antigene peptide nucleic acids[J]. Nature Chemical Biology. 2005, 1(4): 210-215.

[43] Ivanova G D, Arzumanov A, Abes R, et al. Improved cell-penetrating peptide-PNA conjugates for splicing redirection in HeLa cells and exon skipping in mdx mouse muscle.[J]. Nucleic Acids Research. 2008, 36(20): 6418-6428.

[44] Patenge N, Pappesch R, Krawack F, et al. Inhibition of Growth and Gene Expression by PNA-peptide Conjugates in Streptococcus pyogenes[J]. Molecular Therapy - Nucleic Acids. 2013, 2(11): e132.

[45] Torres A G, Fabani M M, Vigorito E, et al. Chemical structure requirements and cellular targeting of microRNA-122 by peptide nucleic acids anti-miRs[J]. Nucleic Acids Research. 2012, 40(5): 2152-2167.

[46] Mcneer N A, Chin J Y, Schleifman E B, et al. Nanoparticles deliver triplex-forming PNAs for site-specific genomic recombination in CD34+ human hematopoietic progenitors.[J]. Molecular Therapy. 2010, 19(1): 172-180.

[47] Chin J Y, Glazer P M. Repair of DNA lesions associated with triplex - forming oligonucleotides[J]. Molecular Carcinogenesis. 2009, 48(4): 389.

[48] Mcneer N A, Schleifman E B, Cuthbert A, et al. Systemic delivery of triplex-forming PNA and donor DNA by nanoparticles mediates site-specific genome editing of human hematopoietic cells in vivo[J]. Gene therapy. 2013, 20(6): 658-669.

[49] Bahal R, Quijano E, Mcneer N A, et al. Single-Stranded γPNAs for In Vivo Site-Specific Genome Editing via Watson-Crick Recognition[J]. Current Gene Therapy. 2014, 14(5): 331-342.

[50] Svasti S, Suwanmanee T, Fucharoen S, et al. RNA repair restores hemoglobin expression in IVS2–654 thalassemic mice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009, 106(4): 1205-1210.

[51] Chin J Y, Reza F, Glazer P M. Triplex-forming Peptide Nucleic Acids Induce Heritable Elevations in Gamma-globin Expression in Hematopoietic Progenitor Cells[J]. Molecular Therapy. 2013, 21(3): 580-587.

[52] Wiesingermayr H, Vierlinger K, Pichler R, et al. Identification of human pathogens isolated from blood using microarray hybridisation and signal pattern recognition[J]. BMC Microbiology. 2007, 7(1): 1-17.

[53] Schleifman E B, Bindra R, Leif J, et al. Targeted disruption of the CCR5 gene in human hematopoietic stem cells stimulated by peptide nucleic acids.[J]. Chemistry & Biology. 2011, 18(9): 1189-1198.

[54] Jörk N, Srinivas R, I. A J, et al. Duplex DNA-Invading γ-Modified Peptide Nucleic Acids Enable Rapid Identification of Bloodstream Infections in Whole Blood:[J]. Mbio. 2016, 7(2): e316-e345.

[55] Radic M, Goic-Barisic I, Novak A, et al. Evaluation of PNA FISH® Yeast Traffic Light in identification of Candida species from blood and non-blood culture specimens[J]. Medical Mycology. 2016, 54(6): 654-658.

[56] Koltai H, Weingarten-Baror C. Specificity of DNA microarray hybridization: characterization, effectors and approaches for data correction[J]. Nucleic Acids Research. 2008, 36(7): 2395-2405.